

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 146

Travail du Laboratoire de Pharmacie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie

CONTRIBUTION A L'ESSAI CHIMIQUE

des

Préparations Galéniques de Strophanthus

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 18 Décembre 1929

PAR

Ernest LABARGE

Pharmacien, Licencié ès sciences

Né le 26 Août 1902, à Maizilly (Loire)



LYON ET VILLEURBANNE
ASSOCIATION TYPOGRAPHIQUE

P. PINTAPARIS, Directeur

1929

CONTRIBUTION A L'ESSAI CHIMIQUE
des
PRÉPARATIONS GALÉNIQUES
de
STROPHANTHUS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 146

Travail du Laboratoire de Pharmacie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie

CONTRIBUTION A L'ESSAI CHIMIQUE

des

Préparations Galéniques de Strophanthus

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 18 Décembre 1929

PAR

Ernest LABARGE

Pharmacien, Licencié ès sciences

Né le 26 Août 1902, à Maizilly (Loire)



LYON ET VILLEURBANNE
ASSOCIATION TYPOGRAPHIQUE

P. PINTAPARIS, Directeur

1929

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire M. L. HUGOUNENQ
Doyen M. J. LEPINE.
Assesseur..... M. ROLLET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE, BARD, LANNOIS

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC.
Cliniques chirurgicales	PAVIOT.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	TIXIER
Clinique ophtalmologique	BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	ROLLET.
Clinique des maladies des enfants.....	NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes.....	LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....	COLLET.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie...	ROCHET.
Chimie biologique et médicale.....	NOVE-JOSSERAND
Chimie organique et Toxicologie.....	CLUZET.
Matière médicale et Botanique.....	HUGOUNENQ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	MOREL.
Anatomie	BRETIN.
Histologie	GUIART.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie interne	POLICARD.
Pathologie et Thérapeutiques générales.....	DOYON.
Anatomie pathologique	FROMENT.
Chirurgie opératoire	CADE.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.	FAVRE.
Médecine légale	PATEL.
Hygiène	ARLOING (F.).
Thérapeutique	ETIENNE MARTIN.
Pharmacie	COURMONT (P.).
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	SAVY.
	LEULIER
	PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe.....	MM. VALLAS.
— — Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN.
— — Chimie minérale	BARRAL.
— — Urologie	GAYET.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. TIEVENOT (Léon).
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	RHENTER.
Chirurgie expérimentale	TAVERNIER.
Applications du radium.....	NOGIER.
Stomatologie	TELLIER.

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
GARIN.	MAZEL.	CHEVALLIER.	MARTIN (Joseph).
TRILLAT.	SANTY.	DUMAS.	ROCHET (Ph.).
SARVONAT	DUNET.	DUFOURT.	WERTHEIMER.
FLORENCE (G.).	CHALIER (André)	DEVIC.	GATE.
ROCHAIX.	CHALIER (Joseph).	GABRIELLE.	BERNHEIM.
RHENTER.	NOEL.	MANCEAU.	DECHAUME.
			POLLCSSON.

M. BAYLE, Secrétaire

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. LEULIER, Président — M. MOREL, Assesseur.
M. BRETIN, Professeur. — M. MANCEAU, Agrégé.



La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MA FEMME.

A MA FILLE.

A MA GRAND'MÈRE.

A MES PARENTS.

En témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance.

A MA SŒUR.

A MA TANTE.

Hommage de mon affectueuse reconnaissance.

A TOUS LES MIENS.

A MES AMIS.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE,

M. LE PROFESSEUR A. LEULIER,

*Professeur de Pharmacie,
Chevalier de la Légion d'honneur.*

A. M. LE PROFESSEUR A. MOREL,

*Professeur de Chimie organique et de Toxicologie,
Chevalier de la Légion d'honneur.*

A M. LE PROFESSEUR BRETIN,

*Professeur de Matière médicale et de Botanique,
Chevalier de la Légion d'honneur.*

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MANCEAU.

Hommages respectueux.

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ.

AVANT PROPOS

Qu'il nous soit permis, avant d'exposer ce travail, de remercier nos Maîtres et ceux qui nous ont aidé dans notre tâche.

Notre reconnaissance va tout d'abord à M. le Professeur Leulier qui voulut bien nous accepter dans son laboratoire et nous suggéra ce travail. Ce Maître ne cessa d'orienter nos recherches et nous apporta toujours l'appui de son aide éclairée et bienveillante. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

Nos remerciements vont également à M. le Professeur Morel, qui voulut bien s'intéresser à nous. Au cours de nos études, il nous prodigua son enseignement et ses conseils ; qu'il veuille bien recevoir nos hommages reconnaissants.

Nous devons à M. le Professeur Bretin tous nos remerciements pour la bienveillance qu'il nous a témoignée et l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger notre travail.

M. le Professeur agrégé Manceau a bien voulu faire partie de notre jury de thèse, nous l'en remercions vivement.

Nous devons un témoignage tout spécial de sympathie à notre camarade et ami Henri Griffon, pharmacien lieutenant, qui facilita notre tâche par l'aide bienveillante qu'il nous apporta.

INTRODUCTION

Depuis la première étude sur la strophanthine faite par Fraser (1), qui l'avait isolée du *Strophanthus kombé*, de nombreux auteurs ont étudié et proposé différents dosages de ce glucoside, soit dans les semences de strophanthus, soit dans leurs préparations galéniques.

Le premier procédé d'extraction indiqué par Hardy et Gallois (2) ne permettait pas d'obtenir le glucoside lui-même, mais bien, comme le firent remarquer MM. A. Gorris et Ch. Wischniac (4), son produit de dédoublement : la strophanthidine ; l'extraction étant effectuée en milieu acide.

En 1896, John Barclay (3) publie dans le *Pharmaceutical Journal* une méthode de dosage de la strophanthine dans la teinture de strophanthus.

En 1905, Cæsar et Loretz (5) donnent une technique de dosage dont M. H. Modeen (6) proposa ultérieurement une modification.

Tandis que les méthodes, jusqu'ici indiquées, se basaient sur l'extraction du produit d'hydrolyse de la strophanthine, Fraser (2) préconise la séparation de ce glucoside par une combinaison tannique. Haycock (7), après une critique sévère de ce procédé, revient de nouveau au dosage par hydrolyse, tandis que Dowzard (21) préconisait un dosage polarimétrique de la strophanthine.

De leur côté, les physiologistes, après les travaux de

Focke (8) et Luigi Scofone (9), proposèrent et firent adopter, par certaines pharmacopées, le dosage physiologique de la strophanthine comme cardiotonique.

Enfin MM. A. Leulier et Griffon (33), reprenant l'étude des réactions colorées de la strophanthine par l'acide sulfurique concentré, remarquèrent que la coloration verte donnée par la strophanthine en milieu chloroforme et anhydride acétique, en présence d'acide sulfurique concentré, était proportionnelle à la quantité de strophanthine. Un procédé de dosage fut mis au point ; c'est celui que nous avons appliqué pour les essais de dosage de quelques teintures et extraits de *strophanthus*.

En ce qui concerne les recherches bibliographiques, faites au sujet de ce travail, il ne nous a pas toujours été possible de retrouver les originaux, dans plusieurs cas nous avons dû nous en tenir à citer les références données par les auteurs.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

A. — Ouabaine et strophanthines ; les propriétés qui permettent leur dosage.

L'ouabaine a été isolée pour la première fois en 1877, par Hardy et Gallois (22) des semences de *Strophanthus glaber*, alors que ces auteurs se croyaient en présence de *Strophanthus hispidus*. Le produit qu'ils obtinrent était cristallisé en lames quadrilatères, lévogyre et de nature non alcaloïdique. Catillon (23), en 1888, reprenant cette étude, obtint un produit présentant les mêmes caractères ; il constata qu'il s'agissait d'un glucoside non azoté. Ne précipitant pas en solution diluée par le tanin, ce produit se différenciait ainsi des autres strophanthines ; traité par l'acide sulfurique, il donnait une coloration rouge. Catillon étudia sa solubilité dans l'eau, sa toxicité

pour le lapin par voie sous-cutanée et conserva à ce produit le nom de strophanthine. Ce ne fut qu'en 1918 qu'il employa le nom de G. Strophanthine.

En 1888, Arnaud, ayant à son tour entrepris l'étude du principe actif des semences de *Strophanthus glaber*, constata que le produit obtenu était absolument identique à celui qu'il avait lui-même retiré de l'*Acokantera ouabaïo*. Il l'appela donc ouabaïne. Il constata les mêmes caractères physiques et chimiques que les auteurs précédents, caractères résumés par M. Tiffeneau en un tableau que nous reproduisons plus loin. Il en donne le point de fusion (+185°), les différentes solubilités dans l'eau (1,57 % à 30°, 6,50 % à 50°), le pouvoir rotatoire (—30°6 en solution à 1 % à la température ordinaire, —33°8 en solution à 6,5 % à 50°), l'eau de cristallisation (3 H²O à 60°, 9 H²O à la température ordinaire). Il démontra enfin que l'ouabaïne donne par dédoublement du rhamnose qu'il titra par réduction.

Brauns et Closson (28) confirmèrent cette donnée par pesée du méthyl-furfurol-phloroglucide qui en dérive.

En 1904, Thoms (29) retira du *Strophanthus gratus* par un procédé nouveau un principe actif qu'il identifia avec l'ouabaïne d'Arnaud. D'après M. Tiffeneau (30), Thoms, dès cette époque, aurait remarqué la stabilité et la constance de composition de ce glucoside et il aurait proposé de le substituer aux autres strophanthines du commerce dont il avait reconnu la composition et l'activité variables.

La strophanthine, dit le Codex (10) est retirée des semences de *Strophanthus hispidus*, elle doit être nettement différenciée de l'ouabaïne. La strophanthine que

décrit la pharmacopée française est cristallisée « en aigüilles aplaties, fasciculées, opaques, à aspect micacé; « elle est incolore, sa saveur est fort amère. Elle fond à « + 185°. La strophanthine se dissout dans 40 parties « d'eau, en formant une liqueur qui donne une mousse « persistante par l'agitation, dans 13 parties d'alcool « absolu à + 15°, et dans 4 parties environ à l'ébullition. « Elle est insoluble dans la glycérine, insoluble dans « l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone, la benzine.

« La strophanthine est dextrogyre ; son pouvoir rotatoire spécifique est $AD = +30^\circ$, lorsqu'on observe sur « une solution aqueuse contenant 2 gr. 3 de strophanthine dans 100 centimètres cubes.

« Elle n'agit pas sur les réactifs colorés. Son soluté aqueux ne réduit pas la solution cupro-alcaline, même « à chaud ; il réduit à chaud la solution d'azotate d'argent.

« La strophanthine officinale est hydrolysée par les « acides dilués et chauds, le soluté aqueux de strophanthine aigüisé d'acide sulfurique et chauffé, laisse déposer ensuite, par refroidissement, des cristaux de strophanthidine; le liquide réduit alors la solution cupro-alcaline.

« L'acide sulfurique concentré et froid colore la strophanthine en rouge brun, passant bientôt au vert. Le « soluté aqueux, additionné d'une trace de perchlorure de fer, puis d'acide sulfurique concentré, donne un « précipité rouge brun qui, après deux heures, aura pris « une coloration vert foncé ; cette réaction est encore « nette avec de faibles quantités de strophanthine.

« Le tanin précipite en blanc le soluté aqueux de strophanthine ; le précipité est soluble dans un excès de « soluté. »

Dans un excellent article, M. Tiffeneau (11) montra que les propriétés physiques de la strophanthine décrite par le Codex avaient été artificiellement composées. Cette strophanthine « fantôme », comme l'appelle cet auteur, ne peut être obtenue cristallisée, et précisément dans le commerce on ne trouve qu'un produit amorphe.

Résumant les nombreuses études faites sur la question, M. Tiffeneau rassemble en un tableau que nous reproduisons ci-après, les produits étudiés avec leurs origines, leurs réactions, leurs constantes physiques, d'après différents auteurs.

De cette étude, il ressort que l'individualité de l'ouabaïne est très nette, alors que les strophanthines apparaissent multiples.

Sans entrer davantage dans l'étude chimique des strophanthines, à laquelle s'est particulièrement intéressé l'auteur précédemment cité, nous rappellerons simplement les propriétés permettant un dosage de ces glucosides.

La possibilité d'extraction des strophanthines par l'alcool, leur pouvoir rotatoire, ont été tour à tour essayés dans ce but, mais ce sont surtout des réactions de précipitation, de dédoublement et de coloration qui ont servi à leur dosage.

Comme on l'a vu précédemment, les strophanthines donnent facilement avec le tanin des combinaisons permettant d'isoler ces glucosides en vue d'une détermination gravimétrique ultérieure.

Les strophanthines, d'autre part, se dédoublent par hydrolyse en un sucre et un produit cristallisé: la strophanthidine. L'ouabaïne dans ce cas, donne un sucre et une résine. La strophanthidine, grâce à sa solubilité dans le chloroforme peut être facilement isolée et par suite servir à un dosage indirect de la strophanthine.

On peut utiliser dans le même but le pouvoir réducteur des sucres provenant du dédoublement des strophanthines. Fraser (25) trouva, en effet, qu'une solution à 3,30 % de strophanthine et 0,30 % d'acide sulfurique abandonnée pendant six jours avait fourni 33,7 % de strophanthidine et 22 % de glucose. Feist (26), d'autre part, dit avoir obtenu par hydrolyse un sucre correspondant à la formule $C^{13} H^{24} O^{10}$, à point de fusion de 107° , cristallisé, non réducteur, non fermentescible et ne se combinant pas avec le phénylhydrazine. Cet auteur considère ce sucre comme l'éther méthylique d'un biose formé par le d. mannose et le rhamnose. Pour notre part, nous avons obtenu un sucre réducteur que nous avons dosé par la méthode de dosage du glucose de Bertrand ; les résultats exprimés en glucose et en cuivre seront donnés plus loin.

Suivant leurs origines, les strophanthines, traitées par l'acide sulfurique donnent tantôt une coloration verte, virant ensuite au rouge, tantôt une coloration rouge, virant au vert, après un temps variable. On obtient les mêmes réactions en imprégnant une coupe transversale de semence de strophanthus d'une goutte d'acide sulfurique.

César et Loretz (22) ont montré qu'il existe un rapport entre l'essai de coloration verte surtout et la teneur en

TABLEAU DE M. TIFFENEAU

	OUABAÏNE	K. — STROPHANTHINE KOMBÉ. Cristallisée.
<i>Auteurs</i>	Catillon (1887). Arnaud (1886). Arnaud (1898). Thoms (1904).	Catillon (1887). Arnaud (1888). Thoms (1904). Heffeter et Sachs (1912).
<i>Fabricants</i>	Catillon. Nativelle. Merck. Gustrow. Chem. Fab. Gustrow.	
<i>Forme cristalline....</i>	Tables quadrilatères.	Aiguilles prismatiques souvent groupées en étoiles.
<i>Réaction au tournesol.</i>	Neutre.	Neutre.
<i>Coloration av. SO^4H^2</i>	Rose ou rouge.	Verte instantanée.
<i>Point de fusion du produit anhydre...</i>	185° (A). 187°-188° (T).	165° (A). 177°-181° non anhydre. 177°-181° (H et S). 178°-179° (B. et C).
<i>Solubilité dans l'eau. pour 100.....</i>	à 8° = 0,68 (A). à 18° = 2,50 (A). à 20° = 2,20 (C). à 30° = 1,57 (A 1898). à 50° = 6,50 (A).	à 18° = 1,99. à 18° = 2,32 (A). à temp. ord. = 2,50 (C). à 100° = 6,66 (A).
<i>Pouvoir rotatoire en solution aqueuse..</i>	Lévogyre. 30°8 (T) sol. 1 %, temp. ordinaire. 30°6 (A) sol. 1 %, temp. ordinaire. 33°8 (A) sol. 6,5 %, à 50°.	Dextrogyre. +28°7 (B et C) 0,8 %. +28°72 (H et S) 1,95 %. +30° (A) 2,3 %.

B. S. P. Février 1922

K. — STROPHANTHINE KOMBÉ. Amorphe.	H. — STROPHANTHINE (HISPIDUS). Cristallisée.	II. — STROPHANTHINE (HISPIDUS). Amorphe.
Heffeter et Sachs (1912).	Kohn et Kulish (1898).	Catillon (1887). Arnaud. Thoms. Heffeter et Sachs.
Boehringer. Burroughs et Well- come. Gehe. Merck. Parke et Davis.		
Amorphe.	Microcristalline.	Amorphe.
Acide.		Acide.
Verte instantanée.	Rouge puis verte.	Verte non instantanée.
170° (H et S). 180° (B et C).	179° (K et K).	Ramollissement. vers 160°. Fusion au-dessus de 190°.
Beaucoup plus soluble que K Strophanthine cristallisée.		
Dextrogyre. 11°87 (H et S) 8,57 %. 20°6 (B. et C) 1,6 %. 12°65 (Merck) 5 %.	Inactive ou faiblement lévogyre (K et K).	Dextrogyre. 13°9 (H et S) 3,48 %.

strophanthine des semences. Les résultats que donnent ces auteurs mettent ce fait en évidence assez nettement.

« L'essai a porté sur 20 semences choisies dans chaque lot soumis à l'analyse. »

	Teneur p. cent en strophanthine	Essai à l'acide sulfurique Nombre de semences donnant la réaction	
		Verte	Rouge
I.....	7,76	18	2
II.....	8,05	19	1
III.....	2,43	6	14
IV.....	3,54	8	12
V.....	2,56	3	17
VI.....	2,64	1	19

Ces réactions et leurs applications ont été particulièrement étudiées par MM. A. Leulier et H. Griffon (33).

« Nous avons observé, disent ces auteurs, que certaines strophanthines étaient susceptibles de donner des réactions colorées analogues à celles des stérols végétaux ou animaux. C'est ainsi que la réaction de Liebermann et celle de Pettenkofer (réaction furfurol sulfurique) sont très nettement positives. Puis nous avons retrouvé dans les mémoires de Jacobs (12) et de ses collaborateurs la mention qu'une strophanthidine étudiée par eux donnait une réaction vert olive par l'anhydride acétique et l'acide sulfurique en milieu chloroformique... »

MM. A. Leulier et H. Griffon font d'abord une étude qualitative des réactions. Pour celle de Liebermann, « lorsqu'on opère sur les strophanthines amorphes du commerce, on observe que la coloration se développe très lentement. Cela tient à ce que le glucoside est difficilement soluble dans le milieu réactionnel et insoluble

dans le chloroforme. On peut opérer de la façon suivante : une trace de glucoside est traitée par 2 centimètres cubes d'anhydride acétique, puis par 2 centimètres cubes de chloroforme et enfin par 2 gouttes d'acide sulfurique concentré. La coloration vert olive atteint son maximum d'intensité après une demi-heure de contact.

Quelle que soit la suite des colorations données par l'acide sulfurique concentré, les strophanthines amorphes commerciales donnent par cette technique la même teinte verte. Il convient de noter que parmi les échantillons traités par nous, aucun d'eux ne contenait de produits solubles dans le chloroforme, ce qui démontrait l'absence de cymarine décrite par Jacobs et ses collaborateurs.

Si l'on soumet l'ouabaine cristallisée à un traitement analogue, on observe des teintes tout à fait différentes. Le liquide se colore en effet en jaune vif qui s'accroît peu à peu en virant vers l'orange.

De ces observations, on peut donc conclure que la réaction de Liebermann permet de diviser en deux groupes les glucosides strophanthiques tout aussi facilement que l'action de l'acide sulfurique concentré.

Il semblait logique de remédier à l'insolubilité des glucosides dans le chloroforme en opérant sur leur produit d'hydrolyse. C'est ainsi que nous avons isolé de la strophanthidine bien cristallisée en chauffant au bain-marie à $+80^{\circ}$ en présence de 1 % d'acide sulfurique concentré une solution aqueuse de glucoside amorphe. Avec ce corps, la réaction prend une coloration plus nette qui arrive à son maximum après 15 ou 20 minutes.

Si on soumet l'ouabaine à l'hydrolyse acide à chaud.

le produit de dédoublement est amorphe et coloré en jaune plus ou moins foncé. C'est là un inconvénient grave, puisque la teinte finale est elle-même jaune. C'est pourquoi dans ce cas particulier, il vaut mieux opérer sur une trace de glucoside lui-même et attendre une demi-heure pour obtenir l'intensité la plus forte de la coloration.

La réaction colorée donnée par l'ouabaïne reste dans le même ordre de coloration, même après 24 heures ; mais il n'en est pas de même pour la coloration verte des strophanthines amorphes. En effet, la teinte yire progressivement vers le jaune et après un temps variable (4 à 12 heures), on observe une belle teinte jaune feu.

Le protocole adopté pour la réaction furfurol-sulfurique (réaction de Pettenkofer modifiée) est le suivant : une trace de glucoside (strophanthine amorphe ou bien ouabaïne) est dissoute dans un demi-centimètre cube d'alcool absolu, puis on ajoute un dixième de centimètre cube de solution furfurolique à 1 % dans l'alcool à 95°; enfin, on fait couler sans mélanger un demi-centimètre cube d'acide sulfurique concentré qui gagne le fond du tube. A la limite de séparation, on observe immédiatement ou presque un anneau bleu outre-mer pour les glucosides amorphes et gris violacé pour le glucoside cristallisé. Si on mélange les réactifs, la coloration bleue envahit tout le liquide pour les premiers, alors que le mélange devient gris violacé terne pour le second. Cette technique est en somme identique à celle que Coquet (16) préconise pour le microdosage du cholestérol sanguin. Il est juste de noter que Draggendorf (17) avait eu recours au furfurol sulfurique pour l'identification

des glucosides strophanthiques, mais il avait noté une coloration rouge. De même, Brissemoret et Joanin (18) caractérisent l'extrait hydro-alcoolique de graines de strophanthus par une réaction utilisant le furfurool. En traitant 0 gr. 50 d'extrait par l'éther, on obtient après évaporation de ce solvant un résidu qui, traité par quelques gouttes d'acide sulfurique et de furfurool, prend une coloration cramoisie. On peut se demander dans ce dernier cas si les stérols normalement contenus dans les graines n'interviennent pas dans cette réaction.

B. — **Extraction et caractérisation du stérol des graines de Strophanthus.**

Comme nous le verrons ultérieurement dans l'exposé de la technique de dosage que nous avons adoptée, il convient d'éliminer soigneusement les pigments et les stérols, ce à quoi on arrive d'une part, en reprenant par l'eau le résidu d'évaporation de la teinture, et d'autre part en déféquant le liquide obtenu. En effet, ces corps donnent la réaction de Liebermann et seraient susceptibles de fausser le dosage colorimétrique de la strophanthidine.

Nous avons eu l'idée d'extraire le phytostérol de l'huile de strophanthus résultant du dégraissage des graines qui nous ont servi à préparer ultérieurement une teinture, suivant le vœu de la Conférence internationale pour l'unification de la formule des médicaments héroïques (20). 200 grammes de graines de strophanthus ont

ainsi fourni 67 gr. 60 d'huile verte et visqueuse. La teneur en huile des semences est donc de 33,80 %, voisine par conséquent de celle indiquée par M. Bretin : 31,5 à 32 %.

Extraction du phytostérol de l'huile de Strophanthus. — La technique que nous avons utilisée est à peu de chose près celle de Böwer, adoptée en 1906 pour la recherche du phytostérol dans le beurre par la Conférence internationale (27). Elle consiste à séparer les matières insaponifiables du corps gras total saponifié, puis à y rechercher le phytostérol par l'examen microscopique et par la détermination du point de fusion de son acétate.

Séparation des matières insaponifiables. — L'huile placée dans une capsule de porcelaine, a été additionnée de solution alcoolique de potasse caustique en excès. On remue et on chauffe au bain-marie jusqu'à limpidité. Le chauffage est continué 30 minutes.

Après refroidissement, on a vérifié que toute l'huile a été saponifiée en essayant, sur une parcelle, sa complète solubilité dans l'eau.

La masse savonneuse, totalement privée d'alcool, est ensuite dissoute dans de l'eau chaude en quantité suffisante, et la solution obtenue refroidie, introduite dans une ampoule à décantation de 2 litres. On additionne d'éther (200 centimètres cubes environ), agit et laisse reposer pour obtenir la séparation complète des deux liquides. L'éther recueilli et évaporé laisse un résidu jaune où se forment des cristaux constitués en grande partie par du phytostérol qu'il convient de purifier.

Purification du phytostérol. — Le phytostérol brut est dissous dans 25 centimètres cubes de chloroforme et additionné ensuite de 2 grammes de noir animal comme décolorant. Après agitation et 3 jours de contact, la solution est filtrée. Le filtrat obtenu est très peu coloré, de même que le résidu qu'il abandonne par évaporation.

Ce résidu, introduit dans un petit cristalliseur, est dissous dans une très petite quantité d'alcool à 95° à la température du bain-marie. Par refroidissement spontané, le phytostérol cristallise en une masse blanche floconneuse. Ces cristaux sont recueillis sur une rondelle de papier filtre disposée dans un petit creuset de Gooch et lavés rapidement à l'alcool fort et froid. Une seconde cristallisation a été effectuée de la même façon. Le produit obtenu est très blanc et très bien cristallisé.

Nous avons fait sur ce phytostérol plusieurs déterminations d'identification : examen microscopique, point de fusion, préparation de l'acétate, point de fusion de ce produit et enfin réactions colorées.

Examen microscopique. — Ces cristaux, en milieu alcoolique, entre lame et lamelle, sous un éclairage faible, apparaissent sous forme de larges tables, très minces, possédant des angles rentrants figurant des escaliers. Ces formes sont en somme semblables à celles des cristaux du cholestérol animal.

Le point de fusion a été déterminé au bloc de Maquenne, par fusion instantanée. Le phytostérol du strophanthus fond dans ces conditions à 138°-139° (*fusion instantanée*).

Essai de l'acétate. — Nous avons suivi la technique de préparation indiquée par Bruno (loc. cit.). Une petite

quantité de phytostérol est introduite dans un petit tube à essais en verre Pyrex avec 2 ou 3 centimètres cubes d'anhydride acétique, puis on chauffe à l'ébullition pendant 1 minute sur la petite flamme d'un bec Bunsen. L'excès d'anhydride acétique est ensuite évaporé en plaçant le tube incliné au bain-marie.

Le résidu est alors dissous à chaud dans une très faible quantité d'alcool absolu et, pour obtenir la cristallisation, on laisse refroidir spontanément. Les acétates cristallisent lorsqu'une partie de l'alcool s'est évaporée. Les cristaux sont recueillis dans un creuset de Gooch et lavés avec quelques gouttes d'alcool à 95°. Après une seconde cristallisation effectuée dans les mêmes conditions, le point de fusion a été déterminé au bloc de Maquenne. Point de fusion de l'acétate : 123°-124° (*fusion instantanée*).

Réactions colorées du phytostérol strophanthique. — Nous avons essayé sur le phytostérol extrait de l'huile de strophanthus plusieurs réactions colorées caractéristiques des stérols.

Réaction de Liebermann. — Quelques cristaux de phytostérol sont introduits dans un tube à essais et dissous dans 2 centimètres cubes environ de chloroforme. On additionne cette solution de 2 centimètres cubes d'anhydride acétique et de 3 gouttes d'acide sulfurique pur. Une coloration vert-bleu très brillante apparaît dans toute la masse après agitation et augmente d'intensité pendant 20 à 30 minutes pour se maintenir stable pendant 2 ou 3 heures. Elle passe ensuite au jaune.

Réaction de Salkowsky. — Cette réaction qui consiste à additionner d'acide sulfurique une solution chloroformique de stérol, donne avec le phytostérol du strophanthus la même réaction que le cholestérol humain : coloration rouge de l'acide à la partie inférieure, fluorescence verte du chloroforme surnageant.

Réaction furfurol-sulfurique (Réaction de Pettenkofer modifiée). — Nous avons fait cette réaction en suivant la technique indiquée par Coquelet (16) pour le microdosage du cholestérol sanguin.

Dans un petit tube à essais, une petite quantité de phytostérol est dissoute dans 0 cm³ 5 d'alcool à 95°, puis additionnée de 0 cm³ 10 de solution de furfurol à 1 % dans l'alcool à 95°. On laisse ensuite couler le long de la paroi du tube 0 cm³ 5 d'acide sulfurique pur qui gagne le fond du tube. A la limite de séparation de l'acide et du liquide surnageant apparaît immédiatement un anneau bleu. Cette coloration se développe très intense dans tout le liquide lorsqu'on l'agite.

CHAPITRE II.

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DOSAGE DES STROPHANTHINES; LEURS TECHNIQUES

Bien que Douzard ait essayé de doser polarimétriquement les strophanthines, les méthodes de dosage de ces glucosides peuvent se ramener à deux groupes :

A. — Méthodes chimiques.

B. — Méthodes physiologiques.

A. — **Méthodes chimiques.**

Méthode de John Barclay.

Bien que Dowzard ait essayé de doser polarimétriquement le dosage, indique comme déjà essayé, et non satisfaisant, le procédé suivant: la teinture de strophanthus est évaporée ; l'extrait est repris par l'eau, puis agité avec de l'alcool amylique ; le résidu d'évaporation de cette solution amylique serait repris par de l'alcool absolu, séché et pesé. Fraser (13) ayant indiqué un coefficient 32,6 de transformation par hydrolyse de la strophanthine en strophanthidine, Barclay expose le procédé suivant (3) : « On prend 50 centimètres cubes de teinture,

on ajoute 50 centimètres cubes d'eau, on chasse l'alcool par distillation. Le liquide aqueux filtré est agité avec du chloroforme, puis mis à digérer une heure au bain-marie avec de l'acide sulfurique dilué (il y a production d'un dépôt floconneux de strophanthidine). Après refroidissement, le liquide trouble est agité successivement trois fois avec de petites quantités de chloroforme. Ce dernier étant séparé, on évapore par distillation ; le résidu de strophanthidine est séché au-dessous de 150° F. et pesé ». L'auteur donne une table montrant le résultat d'expériences faites sur 6 échantillons de teintures préparées chacune avec des semences de source différente. La moyenne des taux obtenus, dit cet auteur, correspond admirablement bien aux quantités de strophanthine des semences données par Fraser, à savoir 8 à 10 %.

Méthode de Fraser.

Fraser (2), revenant alors à un dosage direct, préconisa la méthode suivante : L'extrait obtenu par évaporation de la teinture est dissous dans l'eau, la strophanthine est alors précipitée par l'acide tannique. Le tannate bien lavé est mis à digérer avec de l'oxyde de plomb récemment préparé et soigneusement mouillé. On sèche et épuise à l'alcool ; la solution alcoolique de strophanthine est alors évaporée jusqu'à faible volume. La strophanthine est ensuite précipitée par l'éther, recueillie par filtration et séchée à douce température.

Méthode de Cæsar et Loretz.

Ces auteurs (5) indiquent pour le dosage de la strophanthine dans les semences de *strophanthus* la méthode

suivante, qui peut être également employée pour la teinture et l'extrait de strophanthus, la technique débutant par l'obtention d'une teinture, puis d'un extrait. 7 grammes de semences finement pulvérisées sont mises à bouillir avec 70 grammes d'alcool absolu une heure au réfrigérant à reflux. On laisse refroidir, filtre et évapore 50 centimètres cubes du filtrat correspondant à 5 grammes de graines dans une capsule de porcelaine. On traite l'extrait à l'éther de pétrole pour le dégraisser, jusqu'à ce que l'éther ne se colore plus. Le résidu insoluble est dissous dans 5 à 10 grammes d'eau bouillante ; on chauffe à l'ébullition, ajoute 5 gouttes de sous-acétate de plomb et filtre dans un flacon de 100 centimètres cubes ; le précipité est lavé à l'eau bouillante. Le plomb est précipité par l'hydrogène sulfuré dont l'excès est chassé par ébullition. On filtre et lave le précipité. Le filtrat et les eaux de lavage qui ont été réunies contiennent la strophanthine et des impuretés. Après addition de 5 gouttes d'acide chlorhydrique, on soumet à l'ébullition deux heures. Le liquide est évaporé à 10 centimètres cubes, puis dilué à 20 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Après refroidissement, on agite deux fois avec 10 centimètres cubes de chloroforme. La liqueur aqueuse est encore fait bouillir une fois, puis réagitée avec du chloroforme ajouté ensuite au premier. Les liqueurs chloroformiques sont évaporées dans une capsule tarée, ce qui permet la détermination pondérale du résidu.

Le poids obtenu, multiplié par 2,182 donne le poids de strophanthine contenue dans 5 grammes de semences.

Méthode de Modeen.

Le procédé indiqué par cet auteur (6) n'est qu'une modification du précédent. Le dégraissage est opéré sur les graines et non sur l'extrait. On épuise ensuite à l'alcool absolu à chaud 1 heure ; on évapore au bain-marie, reprend par un peu d'eau, ajoute 5 gouttes de solution de sous-acétate de plomb et 0 gr. 02 de Kieselgur, puis on procède comme précédemment.

Méthode de Haycock.

Haycock (7), avant d'exposer son procédé, fait une critique sévère de celui de Fraser. Les essais qu'il en fit ne donnèrent pas de résultats satisfaisants au point de vue quantitatif, quoique, ajoute-t-il, la strophanthine obtenue fut de très bonne qualité. Il fait à cette méthode les objections suivantes : il est impossible, dit-il, de connaître la quantité de tanin à employer pour précipiter la strophanthine, à moins de faire une évaluation par un essai préalable. Si la quantité de tanin est trop élevée, un peu de strophanthine pourrait être dissoute (la strophanthine étant soluble dans un excès de tanin) et le résultat est faussé.

Quant à l'oxyde de plomb récemment préparé qui est ajouté, il faudrait une digestion de plusieurs jours à basse température.

D'autre part, il est difficile de chasser toutes les traces de tanin de la solution alcoolique ; Fraser dit lui-même avoir fait trois ou quatre traitements à l'oxyde de plomb pour enlever l'excès de tanin, et pour se débarrasser de l'excès de plomb, il faut faire passer un courant d'acide carbonique pendant 2 ou 3 jours dans la solution. « De

ces considérations, ajoute Haycock, on peut conclure, semble-t-il, que ce procédé n'est pas approprié aux exigences de la chimie moderne.

Haycock expose alors la méthode suivante : les semences pulvérisées sont épuisées soit à l'éther de pétrole, soit à l'éther éthylique qui, ni l'un ni l'autre, n'entraîne de strophanthine. L'extraction de l'huile en premier lieu empêche la formation d'émulsions gênantes dans la suite des opérations. La poudre dégraissée est traitée par l'alcool à 70° ; la teinture obtenue est évaporée à basse température en extrait mou. Cet extrait, après dissolution dans l'eau, est additionné d'acide sulfurique à 25 %, puis agité 3 fois avec de l'éther ayant pour but de faire disparaître les dernières traces d'huile. La solution acide est maintenue 1 heure au bain-marie à 75°, pour obtenir l'hydrolyse complète. Après refroidissement elle est introduite dans une ampoule à décantation et épuisée à 3 reprises par du chloroforme. Les liqueurs chloroformiques sont évaporées dans un récipient taré, le résidu, séché à 65°, est pesé ; le résultat divisé par 0,365 donne le taux de strophanthine.

Méthode de MM. A. Leulier et H. Griffon.

Ces auteurs, après avoir appliqué la réaction de Liebermann aux strophanthines, firent de cette réaction une étude quantitative. « Pour nous permettre de vérifier, disent-ils, si l'intensité de la réaction était strictement proportionnelle au taux de substance en solution, nous avons opéré de la façon suivante : nous avons évaporé des volumes croissants de solution chloroformique titrée de strophanthidine cristallisée. Les résidus ont été repris

par 3 centimètres cubes de chloroforme pur et dans les solutions obtenues, nous avons versé 2 cm³ 5 d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Après 20 minutes de contact, nous avons comparé les teintes au colorimètre et nous avons obtenu des chiffres permettant de construire une courbe s'identifiant avec la courbe théorique. Si en effet, on ramène par le calcul, toutes les lectures à un type unique, par exemple à la hauteur lue pour la solution la plus riche, on obtient les chiffres suivants :

Volume de la solution de strophanthidine	8	6	4	2
Hauteur colorimétrique.....	7	9,38	14	28

En essayant d'étudier l'ouabaïne, nous avons rencontré les difficultés déjà signalées dans le paragraphe précédent. Cependant, en utilisant le glucoside lui-même, nous avons vérifié que l'intensité de la coloration jaune variait proportionnellement à la concentration. Voici comment nous avons opéré : évaporer dans un tube à essais des volumes différents de solution alcoolique titrée d'ouabaïne. Traiter les résidus par le chloroforme, l'anhydride acétique et l'acide sulfurique comme précédemment. Comparer au colorimètre, après une demi-heure. Les chiffres obtenus varient étroitement avec le taux de glucoside, par exemple du simple au double pour des prises d'essais de 1 et 2 milligrammes de glucoside.

Si on conserve les liquides en tubes fermés, on peut faire les déterminations colorimétriques, après 12 ou 24 heures. On note en effet des résultats analogues aux précédents, quoique les teintes aient viré du vert au jaune feu pour la strophanthidine et soient restées jaunes pour l'ouabaïne.

Application aux teintures de strophanthus.

La réaction de Liebermann permet de se rendre compte de la nature des graines utilisées pour la fabrication de la teinture. C'est ainsi que les teintures françaises que nous avons étudiées donnaient en fin de traitement une coloration verte, alors qu'une teinture de marque allemande fournissait une coloration jaune. Sans doute cette différenciation est assez grossière, puisqu'il resterait à distinguer les produits du *Strophanthus kombé* de ceux du *Strophanthus hispidus*.

On peut, aussi bien pour la recherche qualitative que pour le dosage des principes actifs, adopter le même protocole. On peut imaginer différentes techniques, mais, dans tous les cas, il faut que les stérines soient éliminées à coup sûr et cela se conçoit sans peine. On peut profiter de leur insolubilité dans l'eau et évaporer la teinture à sec, puis reprendre le résidu par l'eau et filtrer. Nous avons essayé cette façon d'opérer, mais nous avons vu que, même avant hydrolyse, des pigments jaunes, solubles dans le chloroforme passaient en solution aqueuse. On les retrouvait donc en fin de réaction, aussi les teintes obtenues n'étaient point pures et les lectures donnaient des résultats trop élevés.

Nous avons donc préféré la technique suivante : 20 centimètres cubes de teinture sont évaporés à siccité au bain-marie bouillant dans un cristalliseur à extrait. Le résidu est repris par 18 centimètres cubes d'eau distillée et 2 centimètres cubes de liqueur de Courtonne. On mélange et on filtre. Le filtrat est additionné de 1 gr. 50 de sulfate de soude, il se précipite du sulfate de

plomb que l'on élimine par filtration. On prélève 10 centimètres cubes de filtrat clair et très peu coloré, quelquefois même incolore ; ce volume correspond à 10 centimètres cubes de teinture. On hydrolyse dans un petit Erlenmeyer, après addition de 10 centimètres cubes d'acide sulfurique au 1/10°, au bain-marie à + 80° pendant 45 minutes.

On transvase le liquide froid et trouble dans une ampoule à décantation. On épuise cette liqueur à trois reprises par du chloroforme, 5 centimètres cubes d'abord, puis deux fois 2 cm³ 5. Les 10 centimètres cubes de chloroforme correspondent à 10 centimètres cubes de teinture.

On prélève 2 centimètres cubes de chloroforme clair et on le traite par 2 centimètres cubes d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique pur. On compare après 20 minutes, avec une solution titrée de strophanthidine traitée de la même façon.

Il y a avantage à ce que la solution témoin se rapproche autant que possible de la teinture analysée. Voici les chiffres trouvés sur divers échantillons de teintures (les résultats sont exprimés en grammes de strophanthidine par litre) :

Teinture D.....	1,69	1,69	1,69	1,38	1,40	1,60
Teinture D'.....	1,033	1,24	1,24			
Teinture D''.....	1,63	1,63	1,51	1,86		
Teinture D'''.....	2,32	2,58	2,32	2,73		

B. — Méthodes physiologiques.

Ces méthodes sont basées sur ce fait que les glucosides cardiotoniques, la strophanthine, comme la digitale, arrêtent le cœur de la grenouille en systole ; elles

consistent essentiellement à déterminer la dose de produit ou de préparation capable de provoquer cet arrêt. « Toutes les mesures, dit la Pharmacopée américaine (19) doivent être faites avec le même degré d'exactitude que dans les analyses chimiques quantitatives ». Les animaux sont scrupuleusement choisis comme étant tout à fait normaux par leur vigueur, leur poids, le nombre de leurs pulsations cardiaques. Une heure avant l'essai, les grenouilles sont placées dans un récipient rempli d'eau, à la température de 20° ordinairement. Cette précaution a une grosse importance, les réactions de la grenouille variant avec la température. Un certain nombre de grenouilles sont fixées sur des planchettes ; par une incision de la peau de la région sternale le cœur est mis à nu. Cela fait, on injecte à l'animal la liqueur à titrer à la dose de 1/40^e de son poids, dans les sacs lymphatiques des cuisses. L'heure de l'injection est notée. La pharmacopée américaine recommande de ne pas dépasser en injection la dose de 0 mmgr. 15 par gramme d'animal. Au cas où la préparation à injecter contiendrait plus de 20 % d'alcool, on évapore soigneusement, puis on dilue avec une solution de 0 gr. 7 % de chlorure de sodium. Après l'injection, on observe une succession de troubles cardiaques qu'a très bien résumés Luigi Scofone (9). Un premier stade est caractérisé par une augmentation de volume des pulsations, ensuite on voit des mouvements irréguliers, prenant la forme péristaltique ; dans un troisième stade, on voit se produire l'arrêt systolique du ventricule, puis l'arrêt des oreillettes ; enfin, c'est la paralysie complète du muscle cardiaque, caractéristique de l'intoxication. L'heure sera de nouveau notée.

Les physiologistes américains préfèrent détruire le système nerveux et mettre le cœur à nu seulement 1 heure après l'injection. Les sujets présentant une résistance anormale, ou ceux chez lesquels on trouve le produit non absorbé, seront écartés. Plusieurs essais sont ordinairement nécessaires pour déterminer la dose exacte à injecter.

Suivant la théorie de Focke, la « valeur toxique » V du produit serait proportionnelle au poids P de l'animal et inversement proportionnelle au produit de la dose utilisée D par le temps nécessaire T, pour obtenir l'arrêt du cœur. Cette « valeur toxique » pourrait s'exprimer par la formule suivante :

$$V = \frac{P}{D \times T}$$

La pharmacopée américaine note que la susceptibilité des grenouilles pour les produits de la série de la digitale varie avec les saisons de l'année et que par suite on doit d'abord déterminer la susceptibilité pour une solution d'ouabaine. La dose « standard » d'ouabaine est de 0 gr. 000.0005 par gramme de grenouille ; les quantités « standard » adoptées pour les autres cardiotoniques sont les suivantes :

	Grammes ou centimètres cubes par gramme de grenouille
Digitale :	
Feuilles	0,0006
Extrait fluide.....	0,0006
Teinture	0,006
Strophanthus :	
Semences (sous forme de teinture).....	0,000006
Teinture	0,00006

Si cependant on constate, sur une série de grenouilles, que pour obtenir un arrêt en systole, il faut augmenter la dose d'ouabaïne et la porter à 0 gr. 000.00075, on portera celle de teinture de digitale à 0 mmgr. 009.

A ces méthodes de dosage physiologique de la strophanthine, J. Haycock fait les objections suivantes. On n'est pas absolument sûr, dit-il, que la grenouille soit au moment de l'injection dans des conditions normales. Il n'est pas prouvé d'autre part, que le strophanthus agisse de la même façon sur la grenouille que sur l'homme. Enfin, il est difficile de prouver que les strophanthines ne varient pas de toxicité.

A l'encontre de l'opinion de Haycock, MM. Jeanne Lévy et R. Cahen (31) dans un récent article, exposent les avantages de la méthode physiologique, non seulement pour la détermination de la toxicité des glucosides cardiotoniques : digitaline et ouabaïne, mais encore pour leur identification et leur dosage, et même pour l'établissement d'étalons de contrôle. Ces auteurs ont montré qu'en opérant sur des produits anhydres, on obtient des résultats toujours concordants. « En effet, disent-ils, des expériences antérieures ont montré que la dose minima mortelle reste sensiblement constante si on injecte la même dose d'ouabaïne par kilogramme d'animal et par minute, même lorsque la concentration n'est pas identique, pourvu que la mort de l'animal survienne dans un laps de temps fixé arbitrairement (25 à 30 minutes) ».

La méthode employée par ces auteurs est celle de perfusion lente chez le chien. Ils ont ainsi, en prenant la moyenne de plusieurs séries d'essais, déterminé les doses minima mortelles par kilogramme d'animal de l'oua-

baïne cristallisée, de la G. strophanthine et de l'ouabaine standard de la pharmacopée américaine. « Les recherches ont montré que ces divers produits ont la même toxicité et que leur identité n'est pas douteuse : seules les questions de liquides de cristallisation (eau ou alcool) peuvent intervenir pour modifier les toxicités ». Voici les résultats que donnent ces auteurs :

*Dose minima mortelle par kilogramme d'animal
(en milligrammes).*

Ouabaine crist.		G. strophanthine		Ouabaine standard	
Anhydre	Cristallisée à 9 H ² O	Anhydre	Cristallisée à 9 H ² O	Anhydre	Cristallisée à 9 H ² O
0,1364	0,173	0,1335	0,172	0,140	0,179

Après avoir essayé différents procédés de dosage des strophanthines dans les teintures et extraits de strophanthus, nous avons adopté la méthode de MM. A. Leulier et Griffon. Si, comme le font remarquer ces auteurs, cette méthode ne permet pas un dosage rigoureux des glucosides strophanthiques, elle peut, en se plaçant dans des conditions toujours semblables, être un moyen de comparaison entre les préparations de strophanthus en ce qui concerne leur teneur en strophanthidine, produit apparaissant comme le constituant essentiel des strophanthines.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER.

MÉTHODES ESSAYÉES

A. — Essai de dosage d'une teinture de *Strophanthus* par la méthode de J. Barclay.

La première méthode essayée a été celle de J. Barclay, telle que cet auteur l'a exposée. On sait, comme il a été dit précédemment, que cette méthode consiste d'abord à additionner 50 centimètres cubes de teinture de 50 centimètres cubes d'eau, à évaporer cette teinture jusqu'à disparition totale de l'alcool, puis à filtrer le liquide aqueux. Cette filtration, précisément, nous a paru être un point très délicat, en raison de la très grande difficulté, voir même presque l'impossibilité d'obtenir un filtrat clair. Nous avons essayé d'additionner le liquide aqueux, avant la filtration, d'une petite quantité de talc,

le liquide agité rapidement est jeté sur le filtre, le filtrat obtenu, bien que plus clair, est toujours opalescent. La filtration par le vide sur triple filtre a paru donner un résultat plus satisfaisant, mais dans un cas comme dans l'autre, le lavage suffisant du filtre est très difficilement obtenu.

Le filtrat a été dégraissé à l'éther, puis hydrolysé et épuisé par le chloroforme, suivant la technique. L'évaporation des solutions chloroformiques a été opérée sur un bain-marie couvert, après interposition entre le cristalliseur et le bain-marie d'une feuille de papier filtre, de façon à ne pas provoquer l'ébullition du chloroforme. La strophanthidine obtenue s'est présentée sous forme d'un vernis jaunâtre; après dessiccation dans le vide sulfurique, les pesées ont donné les résultats suivants, pour 2 prises d'essai d'une même teinture, en adoptant le coefficient de transformation 36,5 donné par l'auteur :

	Prise d'essai n° 1	Prise d'essai n° 2
Teneur en strophanthidine p ^r 50 cc. de teinture.....	0 gr. 0404	0 gr. 0445
Teneur en strophanthine calculée pour 100 cc. de teinture.....	0 gr. 2212	0 gr. 242
Différence de teneur pour 100 cc. de teinture....		0 gr. 021
Erreur relative.....		8,6 %

B. — Essai de dosage d'une strophanthine par la méthode de J. Barclay.

La strophanthine employée était amorphe et de provenance française. 50 centigrammes ont été dissous dans 50 centimètres cubes d'eau distillée. Quatre dosages ont

été effectués sur des prises d'essai de chacune 10 centimètres cubes de cette solution. Pour chaque dosage, nous avons fait varier les durées d'hydrolyse au bain-marie et les concentrations en acide, de façon à nous rendre compte si ces facteurs pouvaient avoir une importance. Les résultats ont été les suivants, en employant le coefficient 36,5 :

	Dosage n° 1	Dosage n° 2	Dosage n° 3	Dosage n° 4
Solution de strophanthine.	10 cc	10 cc	10 cc	10 cc
Solution d' $\text{SO}^4 \text{H}^2$ au $\frac{1}{10}$	$\frac{1}{2}$ cc	$\frac{1}{2}$ cc	1 cc	1 cc
Proportion d' $\text{SO}^4 \text{H}^2$ p. cent	0,50 p. cent	0,50 p. cent	1 p. cent	1 p. cent
Durée de l'hydrolyse au bain-marie	1 heure	2 heures	1 heure	2 heures
Poids de strophanthidine trouvé	0 gr. 0544	0 gr. 0286	0 gr. 488	0 gr. 544
Poids de strophanthine calculé	0 gr. 148	0 gr. 0810	0 gr. 133	0 gr. 148
Poids de strophanthine existant.	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10	0 gr. 10
Différence	+ 0 gr. 048	— 0 gr. 019	+ 0 gr. 033	+ 0 gr. 048

Quelles que soient les conditions d'hydrolyse, les résultats sont loin d'être satisfaisants.

Suivant A. Goris et Ch. Wischniac (4), le procédé de dosage basé sur le dédoublement n'aurait pas de valeur pratique. « Il nous manque pour cela la connaissance exacte de la nature de la strophanthine et de la strophanthidine et les conditions nécessaires pour l'hydrolyse quantitative de ce glucoside ».

Le coefficient 2,74 correspondant au rendement 33,70 % signalé par Feist n'est pas théorique et n'est pas non plus constant. Pour l'hydrate à $2 \text{H}_2\text{O}$ et d'après la formule

de Feist ($C^{40}H^{66}O^{19}$), il devrait être de 56 à 57 %, alors qu'il a obtenu 50 et 52 %.

Pour certains auteurs, pour hydrolyser complètement le glucoside, il faudrait employer une solution d'acide chlorhydrique à 0,50 % à une température de 70 à 75°; d'autres exigent 2,4 % et la température d'ébullition. Goris et Wischniac, d'après des essais sur des glucosides purs du commerce ont obtenu des résultats allant du simple au double, suivant la concentration en acide, la durée et la température d'hydrolyse.

Les auteurs n'étant pas d'accord sur le coefficient à adopter, nous nous en sommes tenus tout d'abord au dosage de l'un ou de l'autre des produits de dédoublement des strophanthines. Nous avons donné à titre d'indication seulement, la quantité de glucoside correspondant. Nous avons cependant, comme il sera exposé plus loin, cherché à déterminer par la technique colorimétrique de MM. A. Leulier et Griffon, le coefficient de transformation des strophanthines en strophanthidine.

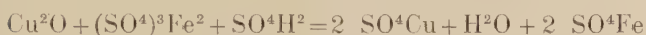
C. — Essai de dosage, par la méthode de Bertrand, du sucre réducteur formé par hydrolyse des strophanthines, à partir d'un glucoside.

Comme on l'a vu précédemment, Fraser le premier, signale qu'une strophanthine laissée en contact pendant six jours avec 0,30 % d'acide sulfurique donna 33,7 % de strophanthidine et 22 % de glucose. Arnaud, d'autre part, montra que l'ouabaine donnait par dédoublement du rhamnose qu'il titra par réduction.

Les essais de dédoublement par hydrolyse que nous

avons faits nous ayant permis d'obtenir un sucre réducteur, nous l'avons dosé par la méthode de dosage du glucose de Bertrand.

Principe de la méthode. — Cette méthode consiste à isoler l'oxydule de cuivre formé par action du sucre réducteur, puis à le traiter par une solution acide de sulfate ferrique, suivant l'équation :



l'oxydule de cuivre passe à l'état de sulfate de cuivre, tandis qu'une partie correspondante de sulfate ferrique passe à l'état de sulfate ferreux, lequel est dosé à l'aide d'une solution titrée de permanganate de potasse. De la quantité de sulfate ferreux on déduit celle de cuivre entré en combinaison et enfin celle de glucose.

Solutions nécessaires.

A) LIQUEUR CUIVRIQUE :

Sulfate de cuivre pur.....	40 grammes
Eau distillée.....	q. s. pour 1 litre

B) LIQUEUR ALCALINE :

Sel de Seignette.....	200 grammes
Soude caustique en plaques.....	150 grammes
Eau distillée.....	q. s. pour 1 litre

C) LIQUEUR FERRIQUE :

Sulfate ferrique.....	50 grammes
Acide sulfurique.....	200 grammes
Eau distillée.....	q. s. pour 1 litre

Cette liqueur ne doit pas réduire le permanganate. On s'en assure en y ajoutant avec précaution quelques gout-

tes de solution de permanganate de potasse. Sinon, cette solution serait ajoutée jusqu'à obtention du résultat.

D) LIQUEUR PERMANGANIQUE :

Permanganate de potasse.....	5 grammes
Eau distillée.....	q. s. pour 1 litre

Dans nos dosages, nous avons utilisé, pour remplacer cette liqueur, une solution décimale de permanganate de potasse. Sachant que un centimètre cube de solution décimale de permanganate de potasse correspond à 0 gr. 00635' de cuivre, le calcul a été modifié de façon appropriée.

Technique employée.

Nous avons opéré de la façon suivante : 4 prises d'essai, A, B, C, D, chacune de 10 centimètres cubes de solution à 1 % de strophanthine dans l'eau distillée, placées dans des Erlenmeyer en pyrex, ont été hydrolysées pendant une heure au bain-marie en présence de 1 centimètre cube de solution d'acide sulfurique au 1/10°. Après refroidissement et extraction de la strophanthidine par le chloroforme, les liqueurs hydrolysées ont été soumises à l'ébullition pendant 5 minutes pour chasser le chloroforme resté en solution.

Dans chacun des Erlenmeyer, nous avons mis :

Eau distillée.....	10 cc.
Liqueur cuivrique.....	20 cc.
Liqueur alcaline.....	20 cc.

Les fioles ont été ensuite portées sur la flamme de brûleurs Bunsen. Après 3 minutes d'ébullition comptées à partir du dégagement des premières bulles de vapeur, on a retiré du feu. Nous avons laissé déposer quelques ins-

tants, puis nous avons décanté le liquide supérieur sur un filtre Durieux sans pli placé avec les précautions voulues sur un entonnoir à filtration rapide en entraînant le moins possible de précipité. (Bertrand conseille de filtrer sur amiante à l'aide de la trompe à vide. M. le Professeur Leulier nous a fait employer cette modification simplifiant les opérations, tout en donnant les mêmes résultats.) Lorsque tout le liquide surnageant a été passé sur le filtre, le précipité d'oxydure de cuivre a été délayé avec un peu d'eau et laissé déposer, puis l'eau de lavage a été décantée sur le filtre. Le précipité, alors additionné de quelques centimètres cubes de liqueur ferrique, est passé au rouge vif, puis au bleu noir pour donner enfin une solution limpide vert-bleue.

D'autre part, après que tout le liquide de lavage a été passé sur le filtre, nous avons versé sur celui-ci à l'aide d'une pipette, quelques centimètres cubes de solution ferrique jusqu'à dissolution complète de toutes les parcelles d'oxydure de cuivre, cette solution a été recueillie dans chacun des Erlenmeyer correspondant.

Dans chaque fiole, nous avons ensuite fait tomber goutte à goutte la solution décimormale de permanganate de potasse jusqu'à ce que la couleur passe du vert au rose.

Résultats. — Si on désigne par n le nombre de centimètres cubes de solution décimormale de permanganate de potasse employés pour obtenir le virage au rose, la quantité de cuivre correspondant en milligrammes sera donnée par la relation :

$$n \times 0,00635 \times 1000, \text{ soit } n \times 6,35.$$

Les tables de Bertrand donnent la correspondance entre le poids de cuivre et celui du glucose.

Les prises d'essais correspondant à 0 gr. 10 de strophanthine, il nous a suffi de multiplier les résultats obtenus par 1000 pour les obtenir en grammes pour 100 grammes de glucoside.

Ces résultats sont les suivants :

Prise d'essai	Nombre de cc. de solution de MnO_4K N/10 employés pour obtenir le virage au rose	Cuivre en mgr. correspondant au sucre réducteur contenu dans la prise d'essai	Sucre contenu dans la prise d'essai calculé en milligrammes de glucose	Sucre calculé en gr. de glucose pour 100 grammes de strophanthine
A	5 cc. 7	36 mgr. 19	18 mgr.	18 gr.
B	5 cc. 4	34 mgr. 29	17 mgr. 04	17 gr. 04
C	5 cc. 8	36 mgr. 83	18 mgr. 1	18 gr. 1
D	6 cc. 5	41 mgr. 27	20 mgr. 5	20 gr. 5

Les différences observées dans les résultats pourraient bien, pour une part, venir du nombre de manipulations successives entraînant des pertes de principe actif. Pour réduire au minimum le nombre des opérations, nous avons déterminé le pouvoir réducteur de la liqueur dans la fiole même ayant servi à l'hydrolyse et sans enlever au préalable la strophanthidine, ce corps n'étant pas réducteur. Trois prises d'essais, A', B', C', chacune de 10 centimètres cubes de solution de strophanthine à 1 % dans l'eau distillée, ont été dosées dans ces conditions. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Prise d'essai	Nombre de cc. de solution N/10 de MnO_4K employés pour obtenir le virage au rose	Cuivre en mgr. correspondant au sucre réducteur contenu dans la prise d'essai	Sucre contenu dans la prise d'essai calculé en milligrammes de glucose	Sucre calculé en gr. de glucose pour 100 grammes de strophanthine
A'	5 cc. 7	36 mgr. 19	18 mgr.	18 gr.
B'	5 cc. 6	35 mgr. 56	17 mgr. 67	17 gr. 67
C'	5 cc. 8	36 mgr. 83	18 mgr. 1	18 gr. 1

En prenant la moyenne de ces derniers résultats, la quantité de sucre réducteur exprimé en glucose, libéré par l'hydrolyse de 100 grammes de strophanthine, serait de 17 gr. 92. Fraser avait signalé 22 %.

Cette technique paraît donner des résultats assez constants en ce qui concerne une solution de strophanthine donnée. Il n'en serait vraisemblablement pas de même pour toutes les strophanthines, et surtout pour son application aux préparations de strophanthus, des substances sucrées devant être fatalement entraînées dans la liqueur hydrolysée. Un premier dosage serait donc nécessaire avant hydrolyse, et devrait-on encore être certain que la liqueur ne contient ni saccharose ni substances hydrolysables autres que les strophanthines.

En admettant d'autre part que le pouvoir réducteur puisse être exactement estimé, il faudrait connaître le coefficient exact d'évaluation des strophanthines d'après le sucre réducteur.

CHAPITRE II.

DOSAGE DE LA STROPHANTHIDINE DANS QUELQUES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES DE STROPHANTHUS PAR LA MÉTHODE DE MM. A. LEULIER ET GRIFFON

Comparée aux méthodes indiquées par les auteurs, celle de MM. A. Leulier et Griffon donne des résultats relativement constants. C'est cette raison jointe à la simplicité, sinon à l'exactitude de cette méthode, au peu de matériel et au petit nombre de réactifs qu'elle nécessite, qui nous l'ont fait adopter pour nos essais.

A. — Réactifs et matériel nécessaires.

Les réactifs qu'elle demande sont en effet peu nombreux, il suffit d'avoir à sa disposition du chloroforme, de l'anhydride acétique, de l'acide sulfurique pur, de la liqueur de Courtonne et du sulfate de soude.

Quant au matériel, il se réduit à quelques fioles d'Erlenmeyer de 100 centimètres cubes, quelques cristallisoirs, quelques ampoules à décantation, un bain-marie, un colorimètre. (Ce dernier appareil pourrait à la rigueur être supprimé si on opérait par la méthode des dilutions). Le colorimètre employé a été celui de Dubosq.

**B. — Obtention de la strophanthidine et préparation
d'une solution titrée de ce produit.**

En partant d'une strophanthine d'origine allemande et amorphe, nous avons obtenu de la strophanthidine cristallisée en opérant de la façon suivante :

1 gramme de strophanthine, dissous dans 30 centimètres cubes d'eau distillée, puis additionné de 5 centimètres cubes d'acide sulfurique au 1/10° a été introduit dans une fiole d'Erlenmeyer en pyrex de 100 centimètres cubes. La fiole a été ensuite fermée à l'aide d'un bouchon traversé par un tube effilé à son extrémité. Cette précaution a été prise pour éviter une trop grande concentration en acide par suite de l'évaporation de l'eau. L'hydrolyse a été effectuée en maintenant la fiole pendant trois heures et demie au bain-marie à une température variant de 50 à 55° et constamment contrôlée à l'aide d'un thermomètre placé dans un récipient témoin. Après une demi-heure, le liquide est devenu opalescent, puis s'est nettement troublé, enfin des flocons sont apparus, gagnant le fond du récipient ; après trois heures, le liquide supérieur est redevenu parfaitement clair. Après trois heures et demie, jugeant l'hydrolyse terminée, nous avons mis le récipient à refroidir, après quoi le liquide a été introduit dans une ampoule à décantation ; la fiole soigneusement rincée, l'eau de lavage a été ajoutée à la liqueur hydrolysée.

L'épuisement par le chloroforme a été fait d'une façon très minutieuse, par :

2 fois	10 centimètres cubes ;		
2 fois	5	—	—
2 fois	2,5	—	—

A chaque addition de chloroforme, on a agité huit à dix fois, laissant entre chaque agitation un temps de repos, de sorte que l'épuisement complet n'a pas demandé moins de 48 heures. Nous n'avons pas constaté d'émulsions trop gênantes, qui ont été facilement détruites en imprimant à l'ampoule tenue verticalement entre les doigts, de vifs mouvements de rotation autour de son axe.

Les liqueurs chloroformiques ont été recueillies par décantation dans un cristalliseur recouvert d'une plaque de verre. A la fin de l'opération, le récipient ayant été découvert, nous avons abandonné à la cristallisation dans un lieu frais. Après 48 heures, le volume étant réduit à 4 ou 5 centimètres cubes, nous avons vu apparaître un petit cristal, bientôt entouré d'un grand nombre d'autres en forme d'aiguilles, l'ensemble ayant l'aspect d'une rosace. Plusieurs groupes de cristaux se formèrent ainsi qui furent recueillis à la pince, lavés à l'alcool pour enlever la strophanthidine amorphe dont ils étaient souillés à la base comme par un vernis, puis séchés. Le résidu non cristallisé a été dissous dans une petite quantité de chloroforme, mais cette fois le produit d'évaporation fut amorphe jaunâtre. La strophanthidine cristallisée était de coloration jaune clair.

Nous avons dissous 18 ctgr. 6 de strophanthidine cristallisée dans une fiole jaugée dans 100 centimètres cubes de chloroforme. Comme le soulignent Goris et Wischniac (16), la strophanthidine cristallisée est très peu soluble dans le chloroforme, alors que la strophanthidine amorphe, ainsi que l'on fait remarquer MM. A. Leulier et Griffon l'est très facilement. C'est pourquoi la prépara-

tion de la solution de strophanthidine cristallisée est une opération assez longue. 1 centimètre cube de cette solution titrée contient 1 mmgr. 86 de strophanthidine.

C. — Dosage de la strophanthidine dans quelques extraits de strophanthus.

Dans le dosage de la strophanthidine par la méthode de MM. A. Leulier et Griffon, il y a lieu de considérer deux groupes d'opérations, à savoir :

- 1° L'extraction de la strophanthidine ;
- 2° Son dosage colorimétrique.

Cette méthode étant établie pour les teintures, nous l'avons légèrement modifiée pour l'appliquer aux extraits.

a). Extraction de la strophanthidine.

2 grammes d'extrait de strophanthus sont dissous en ajoutant par portions 15 grammes d'eau distillée chaude, la dissolution est aidée par une agitation convenable. La liqueur refroidie est versée dans une fiole jaugée de 20 centimètres cubes, on ajoute 2 centimètres cubes de liqueur de Courtonne, puis on complète à 20 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Après agitation énergique, le mélange est jeté sur un filtre sans pli placé sur un entonnoir à filtration rapide. On élimine l'excès de plomb en agitant le filtrat avec 1 gr. 50 de sulfate de soude desséché. Après filtration, on obtient un liquide limpide légèrement jaune. Dans un petit Erlenmeyer, on met 10 centimètres cubes de filtrat et 10 centimètres cubes d'acide sulfurique au 1/10^e, puis on maintient 1 heure à 80°. Suivant les extraits, nous avons obtenu

après hydrolyse, soit des flocons, soit un trouble homogène.

Le liquide refroidi est introduit dans une ampoule à décantation, la fiole est soigneusement lavée à plusieurs reprises avec de l'eau distillée en s'aidant d'un agitateur, une partie de la strophanthidine se déposant sur les parois du récipient. Les eaux de lavage sont ajoutées à la liqueur hydrolysée. On verse alors dans l'ampoule à décantation, à l'aide d'une pipette jaugée, 5 centimètres cubes de chloroforme. On agite à plusieurs reprises. Il est normal d'admettre que malgré la température d'hydrolyse assez élevée, il ait pu se former un peu de strophanthidine cristallisée très peu soluble dans le chloroforme. Il est donc indispensable que l'épuisement chloroformique soit fait avec tous les soins désirables. Après de nombreuses agitations, on laisse le chloroforme se rassembler à la partie inférieure ; il reste presque toujours une légère émulsion qui est le plus souvent détruite par le temps ou par le procédé déjà indiqué. Le chloroforme soutiré est recueilli dans un flacon bouchant émeri, soigneusement lavé et séché. On épuise de nouveau en insistant de la même façon deux fois par 2 ccm³ 5 de chloroforme.

Les 10 centimètres cubes de solution chloroformique réunis correspondent à 1 gramme d'extrait, un centimètre cube correspond donc à 0 gr. 10 d'extrait.

*b) Dosage colorimétrique des solutions
de strophanthidine.*

Les mélanges réactionnels donnant naissance aux colorations à comparer doivent être préparés de façon rigou-

reusement identique. On utilise des tubes à essais soigneusement lavés et séchés, puis étiquetés.

Dans un tube témoin T, on a mis :

1 centimètre cube de solution titrée de strophanthidine.

2 centimètres cubes d'anhydride acétique.

Dans le tube n° 1, on a mis :

1 centimètre cube de solution de strophanthidine provenant du traitement de l'extrait de strophanthus n° 1.

2 centimètres cubes d'anhydride acétique.

Puis dans chacun des deux tubes, on a ajouté au même moment 3 gouttes d'acide sulfurique pur à l'aide d'un compte-gouttes normal.

Les deux tubes, après agitation, ont été laissés au repos ; la coloration verte s'est développée immédiatement dans les deux tubes, mais plus intense et s'accroissant plus rapidement dans le tube n° 1, indiquant ainsi une teneur en strophanthidine plus élevée, de sorte qu'après 30 minutes, la différence d'intensité entre les colorations des deux tubes était trop considérable pour permettre une colorimétrie précise.

En restant dans les mêmes conditions pour le tube témoin, la quantité de solution de strophanthidine à titrer, à faire entrer dans la réaction parut être en moyenne 0 cc. 5. Pour conserver un milieu réactionnel semblable à celui du tube témoin, il faut à cette quantité ajouter un demi-centimètre cube de chloroforme.

Le même tube témoin sert évidemment pour toute une série de dosages.

c) *Résultats.* — Cinq extraits du commerce et d'origine différente ont été ainsi dosés. Voici les résultats :

Premier dosage.

N° de l'extrait	Hauteurs colorimétriques lues pour la solution témoin	Hauteurs colorimétriques lues pour les solutions à doser
1	10	3,8
2	10	6,7
3	10	10
4	10	7,8
5	10	10

Deuxième dosage.

N° de l'extrait	Hauteurs colorimétriques lues pour la solution témoin	Hauteurs colorimétriques lues pour les solutions à doser
1	11	4,3
2	10	6,6
3	10	10
4	10	7,9
5	10	9,9

Le calcul de la teneur en strophanthidine des extraits peut se faire de la façon suivante. Si nous désignons par :

x : La quantité de strophanthidine contenue dans le tube à doser.

q : La quantité de strophanthidine contenue dans le tube témoin.

h : La hauteur colorimétrique lue pour la solution à doser.

H : La hauteur colorimétrique lue pour la solution titrée de strophanthidine, on a :

$$\frac{H}{h} = \frac{x}{q} \text{ d'où } x = \frac{H \times q}{h}$$

Or $q=1$ mmgr. 86, soit 0 gr. 00186 ; d'autre part, x correspond à 0 gr. 05 d'extrait; la teneur en strophanthidine sera donc donnée par l'équation :

$$x = \frac{H \times 0 \text{ gr. } 00186 \times 2000}{h}$$

Le résultat est exprimé en grammes pour 100 grammes d'extrait.

En effectuant les calculs, voici les taux obtenus :

N° de l'extrait	1 ^{er} Dosage.	2 ^e Dosage	Moyenne des 2 dosages
	Strophanthidine p. cent	Strophanthidine p. cent	Strophanthidine p. cent
1	9 gr. 78	9 gr. 58	9 gr. 68
2	5 gr. 54	5 gr. 62	5 gr. 58
3	3 gr. 72	3 gr. 72	3 gr. 72
4	4 gr. 74	4 gr. 70	4 gr. 72
5	3 gr. 72	3 gr. 74	3 gr. 73

Si nous admettions avec John Barclay que 100 parties de strophanthine donnent à l'hydrolyse 36,5 parties de strophanthidine, nous aurions les résultats suivants, en se basant sur la moyenne des deux dosages :

Extrait n° 1 : 26 gr. 51 % de strophanthine.

» n° 2 : 15 gr. 28 » »
 » n° 3 : 10 gr. 19 » »
 » n° 4 : 12 gr. 93 » »
 » n° 5 : 10 gr. 21 » »

Nous avons rassemblé en un tableau les caractéristiques des extraits dosés.

N° de l'Extrait	Eau p. cent	Cendres p. cent	Strophanthidine p. cent Moyenne des 2 dosages	Strophanthidine p. cent de l'extrait sec	Strophanthine p. cent de l'extrait en admettant le coefficient 0.365 donné par Barclay
1	11 gr. 85	4 gr. 46	9 gr. 68	10 gr. 98	26 gr. 51
2	16 gr. 18	6 gr. 206	5 gr. 58	6 gr. 65	15 gr. 28
3	12 gr. 01	7 gr. 76	3 gr. 72	4 gr. 22	10 gr. 19
4	15 gr. 67	7 gr. 10	4 gr. 72	5 gr. 35	12 gr. 93
5	13 gr. 14	6 gr. 648	3 gr. 73	4 gr. 25	10 gr. 21

Seul l'extrait n° 2 a été préparé avec des semences de *strophanthus* titrées physiologiquement et de valeur : 5,0 (méthode Focke Joanin).

D. — Dosage de la strophanthidine dans quelques teintures de *strophanthus*.

Parmi les teintures essayées, cinq ont été prises dans le commerce à des sources différentes et une a été faite à partir de semences deshuilées. Il est à noter que la XI^{me} Conférence internationale pour l'unification de la formule des médicaments héroïques, réunie à Bruxelles en 1925 (20), a émis le vœu que la teinture de *strophanthus* (*strophanthus gratus*, *hispidus* ou *kombé*), soit faite avec des graines dégraissées.

La technique utilisée pour l'obtention de la solution chloroformique de strophanthidine a été exactement celle indiquée par MM. A Leulier et Griffon ; 1 centimètre de

liqueur chloroformique correspondant à 1 centimètre cube de teinture.

Dans un tube témoin T, nous avons mis :

3 centimètres cubes de solution titrée de strophanthidine :

2 cm³ 5 d'anhydride acétique.

Dans le tube n° 1, nous avons mis :

3 centimètres cubes de solution de strophanthidine à titrer provenant de la teinture n° 1 ;

2 cm³ 5 d'anhydride acétique.

Puis au même moment, dans chaque tube, nous avons ajouté 3 gouttes d'acide sulfurique pur, à l'aide d'un compte-gouttes normal. Après agitation, les tubes ont été laissés au repos une demi-heure ; les solutions ont été alors comparées au colorimètre comme il a été dit pour les extraits. Nous avons opéré de façon identique pour toutes les teintures et voici les résultats obtenus :

No de la teinture	Hauteur colorimétrique	
	lue pour la solution témoin	lue pour les solutions à doser
1	6	11,9
2	6	8,4
3	4	13,9
4	5	9,1
5	7	11
6	10	8,9

Une deuxième série de dosages a été effectuée sur les

mêmes teintures et dans les mêmes conditions. Nous avons obtenu les chiffres suivants :

N ^o de la teinture	Hauteur colorimétrique lue pour la solution témoin	Hauteur colorimétrique lue pour les solutions à doser
1	6	11,9
2	6	8,8
3	4	13,3
4	5	9,2
5	7	10,6
6	10	8

La solution titrée de strophanthidine était la même que celle employée pour le dosage des extraits ; les calculs ont été effectués de façon à exprimer les résultats suivants en grammes de strophanthidine par litre de teinture :

N ^o de la teinture	1 ^{er} Dosage	2 ^e Dosage	Moyenne des 2 dosages
1	0 gr. 936	0 gr. 98	0 gr. 958
2	1 gr. 326	1 gr. 26	1 gr. 293
3	0 gr. 533	0 gr. 576	0 gr. 554
4	1 gr. 020	1 gr. 01	1 gr. 015
5	1 gr. 183	1 gr. 22	1 gr. 205
6	2 gr. 08	2 gr. 32	2 gr. 20

Comme pour les extraits, nous avons tenu à ressembler en un même tableau les caractéristiques des teintures étudiées.

N ^o de la teinture	Acidité exprimé en SO ₄ H ₂ par litre	Extrait sec p. cent	Densité à 15-18°	Teneur en strophanthidine par litre Moyenne des 2 dosages	Teneur en strophanthidine par litre si on admet le coefficient 0,365
1	0 gr. 323	1 gr. 10	0,885	0 gr. 958	2 gr. 624
2	0 gr. 539	2 gr. 05	0,890	1 gr. 293	3 gr. 542
3	0 gr. 19	0 gr. 50	0,882	0 gr. 554	1 gr. 517
4	0 gr. 49	2 gr. 55	0,895	1 gr. 015	2 gr. 780
5	0 gr. 588	2 gr. 60	0,905	1 gr. 205	3 gr. 301
6	0 gr. 686	1 gr. 30	0,887	2 gr. 20	6 gr. 027

L'extrait sec a été déterminé par pesée, après une dessiccation de 14 heures à 105°.

L'acidité a été dosée à l'aide d'une solution de soude N/20, en présence de IV gouttes de phtaléine du phénol pour 10 centimètres cubes de teinture étendus à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée.

La densité a été déterminée à l'aide d'un densimètre ordinaire à la température de 15-18°.

En ce qui concerne l'essai physiologique, deux fabricants seulement donnent une teinture faite avec des semences soumises à cet essai.

La teinture n° 2 a été préparée avec des semences titrées physiologiquement et de valeur : 5,0, d'après la méthode Focke-Joanin.

La teinture n° 5 a été faite avec des semences soumises à un essai physiologique et présentant suivant le fabricant « une toxicité quatre fois supérieure à la normale et entrant par ce fait même dans la règle générale ».

Si nous comparons nos résultats exprimés en strophanthine par litre de teinture de strophanthus avec ceux donnés par les auteurs, nous voyons qu'ils sont à peu près du même ordre. J. Barclay (3) ayant effectué des dosages sur six échantillons de teinture de strophanthus, obtint des résultats allant de 4 gr. 10 à 2 gr. 28 par litre. Astruc (32), d'autre part, donne comme teneur moyenne 3 gr. 50 de strophanthine par litre de teinture.

E. — Essai de dosage en ouabaïne d'une teinture
de *strophanthus* d'origine allemande.

Comme le font remarquer MM. A. Leulier et H. Grif-
fon, une solution chloroformique d'ouabaïne donne par
la réaction de Liebermann une coloration jaune propor-
tionnelle à la concentration en glucoside.

Nous avons évaporé dans un tube à essai 1 centimètre
cube de solution d'ouabaïne à 1 %, le résidu a été repris
par 2 centimètres cubes de chloroforme. Dans un deuxiè-
me tube, nous avons évaporé 2 centimètres cubes de la
même solution, le résidu a été repris également par
2 centimètres cubes de chloroforme. Dans chacun des
deux tubes, nous avons alors mis 2 centimètres cubes
d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique con-
centré, puis nous avons agité. Après 30 minutes, les deux
solutions ont été comparées au colorimètre. Nous avons
obtenu les résultats suivants :

Hauteurs colorimétriques			
	1 ^{re} Détermination	2 ^e Détermination	3 ^e Détermination
Tube n° 1.....	10	12	14
Tube n° 2.....	5	6	7

On voit en effet que les hauteurs colorimétriques sont
rigoureusement proportionnelles à la concentration.

Nous avons essayé de doser une teinture de *Strophan-
thus gratus* d'origine allemande. La technique a été
exactement celle employée pour les teintures précédem-
ment étudiées. 2 centimètres cubes de solution chloro-
formique du produit dédoublement correspondant à 2

centimètres cubes de teinture sont additionnés de 2 centimètres cubes d'anhydride acétique, puis de 3 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Le tube témoin est préparé de la façon suivante : 1 centimètre de solution titrée d'ouabaïne à 1 ‰, correspondant à 0 gr. 001 d'ouabaïne est évaporé dans un tube à essai, le résidu est repris par 2 centimètres cubes de chloroforme, puis additionné de 2 centimètres cubes d'anhydride acétique et de 3 gouttes d'acide sulfurique pur. Après 3 minutes de contact, les deux solutions sont comparées au colorimètre.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Prises d'essai	Hauteurs colorimétriques lues pour le tube témoin		Hauteurs colorimétriques lues pour les tubes à doser			Ouabaïne contenue dans la prise d'essai	Ouabaïne par litre de teinture
	1 ^{er} Essai	2 ^e Essai	1 ^{er} Essai	2 ^e Essai	Moyenne des 2 essais		
A	10	10	3,9	3,8	3,85	0 gr. 00259	1 gr. 295
B	10	10	4,00	4,1	4,05	0 gr. 002469	1 gr. 234

CHAPITRE III.

ESSAI DE DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE TRANSFORMATION DES STROPHANTHINES EN STROPHANTHIDINE

Les auteurs n'étant pas d'accord sur le coefficient à adopter pour la transformation des strophanthines en strophanthidine, nous avons essayé en utilisant la technique colorimétrique, de déterminer la teneur en strophanthidine de quantités connues de strophanthines données.

TECHNIQUE.

La technique utilisée a été la suivante : une quantité connue de strophanthine est hydrolysée en milieu acide. La strophanthidine formée est extraite par trois traitements au chloroforme (comme pour le dosage de la strophanthidine dans les teintures). Sur une partie aliquote de la solution chloroformique, on détermine comparativement à une solution témoin la teneur en strophanthidine, à l'aide de la réaction de Liebermann.

Nous avons utilisé l'acide chlorhydrique et l'acide sul-

furique à des concentrations diverses et nous avons étudié aussi l'influence du temps de chauffage sur l'hydrolyse.

RÉSULTATS.

Essai I. — Trois prises d'essai identiques de 8 centimètres cubes d'une solution aqueuse de strophanthine correspondant chacune à 4 milligrammes de strophanthine, additionnées de 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique, ont été hydrolysées à 80°-90°, pendant des temps variables : 30, 45 et 60 minutes. L'extraction chloroformique a été faite en trois fois, une fois par 5 centimètres cubes de chloroforme et deux fois par 2 centimètres cubes 5. Un centimètre cube de liqueur chloroformique représente donc un centimètre cube de liqueur hydrolysée. Le dosage colorimétrique a été effectué sur 2 centimètres cubes de liqueur chloroformique. Voici les chiffres obtenus :

	Temps d'hydrolyse au bain-marie	Hauteurs colorimétriques lues pour le tube témoin	Hauteurs colorimétriques lues pour les tubes à doser
A	30 minutes	5	12,4
B	45 —	5	12,4
C	60 —	5	12,3

Le tube témoin contenant 0 mmgr. 93 de strophanthidine, en effectuant les calculs, on obtient en strophanthidine les résultats suivants :

	Quantité de strophanthidine
Prise d'essai A.....	0 mgr. 375
— — B.....	0 mgr. 375
— — C.....	0 mgr. 375

Ces chiffres correspondent à 2 centimètres cubes de solution, 10 centimètres cubes contiendraient :

$$\frac{0,375 \times 10,}{2} \text{ soit 1 mmgr. 875.}$$

Cette quantité de strophanthidine correspond à 4 milligrammes de strophanthine, la quantité correspondant à 100 grammes sera donc de :

$$\frac{0 \text{ gr. } 001875 \times 100 \times 1000,}{4} \text{ soit 46 gr. 87.}$$

Essai II. — 8 centimètres cubes d'une solution aqueuse de strophanthine, contenant 4 milligrammes de ce glucoside ont été additionnés de 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique au 1/10°, puis soumis à l'hydrolyse à 80°, pendant 30 minutes.

Le témoin contenait 1 mmgr. 6 de strophanthine.

Hauteur colorimétrique lue pour le tube témoin	Hauteur colorimétrique lue pour le tube à doser	Quantité de strophanthidine contenue dans la prise d'essai
10	8,1	1 mgr. 927

En effectuant les calculs, on trouve que 100 grammes de strophanthine donnent 48 gr. 175 de strophanthidine.

Essai III. — En opérant dans les mêmes conditions que précédemment, mais avec 6 et 10 milligrammes de strophanthine, nous avons trouvé pour 4 dosages :

1°	Pour 100 gr. de strophanthine :	22 gr. 15 de strophanthidine
2°	— — — — —	18 gr. 8 —
3°	— — — — —	22 gr. 13 —
4°	— — — — —	21 gr. 8 —

Par suite sans doute de l'extraction incomplète par le chloroforme, le pourcentage de strophanthidine a été trouvé inférieur.

Tous les essais précédents ont été effectués avec une strophanthine donnant avec l'acide sulfurique une coloration verte. Celle employée pour les essais suivants donnait une réaction rouge dans les mêmes conditions. Cette strophanthine a été desséchée par un séjour de 24 heures dans le vide sulfurique.

Essai IV. — 10 milligrammes de strophanthine (5 centimètres cubes de solution à 2 %) ont été hydrolysés à 80° pendant des temps différents sous l'action d'acide sulfurique de concentration variée. Les résultats ont été les suivants :

Temps de chauffe	5 cc. de solution de strophanthine + 5 cc. SO^4H^2 à 10 p. cent	5 cc. de solution de strophanthine + 5 cc. SO^4H^2 à 20 p. cent
30 minutes	3 mgr. 98	3 mgr. 58
45 —	3 mgr. 58	3 mgr. 56

Les différences constatées sont de minime importance et la moyenne des chiffres donne pour 100 grammes de strophanthine 36 gr. 86 de strophanthidine.

Nous pouvons déduire des expériences précédentes, que, en exceptant les hydrolyses de l'essai III, pour lesquelles l'extraction chloroformique n'a certainement pas été assez poussée, nos coefficients, tout en confirmant par leur irrégularité les contradictions des auteurs, ne s'écartent pas trop de ceux qu'ils donnent.

Le coefficient moyen : 36,86 est en effet très voisin de celui que donne J. Barclay : 36,5.

C'est ce dernier que nous avons employé, à titre d'indication seulement, pour calculer éventuellement le titre en strophanthine des préparations galéniques de strophanthus que nous avons étudiées.

CONCLUSIONS

1° Comme l'ont déjà démontré Jacobs, A. Leulier et H. Griffon, les strophanthines commerciales donnent les réactions des stérols.

2° L'ouabaïne ou strophanthine cristallisée de l'ouabaïo et du *Strophanthus gratus* donne une réaction différente, ce qui permet une identification aussi rapide et aussi nette què les réactions sulfuriques.

3° L'intensité des réactions est proportionnelle à la teneur en glucoside ou à celle de son dérivé de dédoublement (strophanthidine). Un dosage colorimétrique est donc possible.

4° Sans être d'une absolue rigueur, ce dosage permet de se rendre compte de la teneur en principe actif des préparations galéniques de strophanthus.

5° Devant l'impossibilité de fixer un coefficient immuable de dédoublement, il semble avantageux de calculer les teneurs en *strophanthidine*.

6° Les résultats obtenus étant très divergents, il serait à souhaiter que la standardisation des préparations galéniques soit rigoureusement exigée. Le contrôle physiologique devra compléter le contrôle chimique.

7° L'huile de strophanthus renferme un phytostérol dont nous avons déterminé quelques propriétés.

Le Président de la thèse,
A. LEULIER.

Vu :
Le Doyen,
JEAN LEPINE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 30 Novembre 1929

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
JOSEPH GHEUSI

ERRATA

Par suite d'erreurs typographiques, lire :

Page 13, 3^{me} ligne : « *glaber* », au lieu de « *glaler* ».

Page 23, 10^{me} ligne : ...n'interviennent pas dans cette réaction ».

Page 29, 1^{re} ligne : « Dowzard », au lieu de « Douzard ».

Page 29, 8^{me} ligne : « John Barclay en 1896 (3) avant d'exposer sa méthode », au lieu de « Bien que Dowzard ait essayé de doser polarimétrique ».

Page 29, 15^{me} ligne : « 36,2 de transformation », au lieu de « 32,6 de transformation ».

Page 64, 10^{me} ligne : « 30 minutes », au lieu de « 3 minutes ».

BIBLIOGRAPHIE

- (1) D'après A. GORIS et Ch. WISCHNIAC. *Loc. cit.*
FRASER : a) *British Med. Journ.*, juillet 1887.
b) *Pharm. Journ.*, 1885, 16, p. 109.
— — — 1888, 18, p. 6, 69.
— — — 1889, 20, p. 207, 328.
— — — 1889, 19, p. 660.
c) *Trans. Roy. Soc. Edinburg*, 1891, n° 16 ;
1896, n° 21.
- (2) D'après M. TIFFENEAU. *Loc. cit.*
HARDY et GALLOIS. — Sur le principe actif du *Strophanthus hispidus* : strophanthine cristallisée. *Bull. et Mém. de la Soc. de Thérap.*, 1877.
- (3) JOHN BARCLAY. — Laboratory notes : Tincture of strophanthus. *Pharmaceutical Journal*, 1896, p. 463.
- (4) A. GORIS et Ch. WISCHNIAC. — Sur la composition chimique des graines de strophanthus. *B. S. P.*, 1912, t. XIX, p. 488, 549.
- (5) COESAR et LORETZ. — Essai des graines de strophanthus. *Pharm. Journ.*, 1905, t. II, p. 580.
- (6) M.-H. MODEEN. — Sur le dosage de la strophanthine dans les graines de strophanthus. *Ap. Ztg.*, 1910, p. 106.
- (7) J. HAYCOCK. — Graines de strophanthus; leurs essais par les méthodes chimiques. *Pharm. Journ.*, 1911, t. I, p. 553.
- (8) FÖCKE. — *Die Physiologische Wertebertimmung der Digitalisblätter*. *Arch. Phar.*, Berlin, 1903, 241, p. 128, 142.
- (9) LUIGI SCOFONE. — Toxicité comparée de la digitaline sur quelques espèces animales. *Trav. Lab. Thérap. exp.*, Genève, 1893, 1, p. 166, 246.

- (10) Strophanthine. *Codex medicamentarius gallicus*, 1920, p. 686.
- (11) M. TIFFENEAU. — Etude pharmacologique et pharmacodynamique des glucosides strophanthiques : strophanthine et ouabaine. *Bull. Sc. Pharm.*, février 1922, p. 68.
- (12) W.-A. JACOBS et A.-M. COLLINS. — Strophantin, IV anhydrostrophantidin et dianhydrostrophantidin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1924, 59, 713-730.
W.-A. JACOBS et A. HOFMANN. — Strophantidin IX. On crystalline Kombe strophanthin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, 67, p. 609.
- (13) D'après BARCLAY. *Loc. cit. Year boock pharmacy*, 1887.
- (14) FEIST. — Strophanthus et strophanthine. *Ber. Chem. Ges.*, 1898, 31, p. 534.
- (15) GÉRARD. — Essai des préparations de strophanthus. *Précis de manipulations de pharmacie*, p. 46.
- (16) O. COQUELET. — La réaction furfurole sulfurique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 747. — Microdosage colorimétrique du cholestérol. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 749.
- (17) D'après M. TIFFENEAU. *Loc. cit.*
- (18) BRISSEMORET et JOANIN. Essais sur les préparations galéniques de Dausse. Paris, 1908, p. 443.
- (19) The pharmacopœia of the United States of America. Biological assays, 23. Digitalis, strophanthus, squill.
- (20) *B. S. P.*, 1925, XXXII, p. 592.
- (21) D'après J. HAYCOCK, *loc. cit.*
- (22) D'après les « essais » sur les préparations galéniques de Dausse », p. 442. COESAR et LORETZ, *Geschäfts Bericht.*, 1906, p. LV.
- (23) D'après M. TIFFENEAU, *loc. cit.* CATILLON. *Bull. et Mém. de la Soc. de Thérap.*, séance du 14 décembre 1887 ; 1888, 15, p. 25, 32.
- (24) D'après M. TIFFENEAU, *loc. cit.*
 - 1° ARNAUD. *C. R. Ac. Sc.*, 107, p. 1162.
 - 2° ARNAUD. *Bull. Soc. Chim.*, 14 déc. 1888.
 - 3° ARNAUD. *C. R. Ac. Sc.*, 3 avril 1888, 106, p. 111. — *Bull. Soc. Chim.* (2), 1888, 49, p. 451. (1), p. 2, 10.

- (25) FRASER. Cité d'après A. GORIS et Ch. WISCHNIAC.
 - (26) FEIST. Cité d'après A. GORIS et Ch. WISCHNIAC.
 - (27) ALBERT BRUNO. Beurres et graisses animales. Lib. Ch. Béranger, Paris, 1912.
 - (28) BRAUNS et CLOSSON. Cités d'après M. TIFFENEAU.
 - (29) THOMS. Cité d'après M. TIFFENEAU.
 - (30) M. TIFFENEAU. Ouabaïne cristallisée. *B.S.P.*, 1922, p. 184.
 - (31) Jeanne LÉVY et CAHEN. La toxicité des glucosides digitales comme méthode biologique pour leur identification et leur dosage. Digitaline et ouabaïne. *Paris Médical*, 1929, n° 24, p. 587.
 - (32) ASTRUC. Teinture de strophanthus. *Traité de pharmacie galénique*, t. I, p. 516-517.
 - (33) A. LEULIER et H. GRIFFON. Essais de dosage colorimétrique des strophanthines. *B. S. P.*, juillet 1929, p. 408.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

A. — OUABAÏNE ET STROPHANTHINES ; LES PROPRIÉTÉS QUI PERMETTENT LEUR DOSAGE.....	13
B. — EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DU STÉROL DES GRAISSES DE STROPHANTHUS.....	23
<i>Extraction du phytostérol de l'huile de strophan-</i> <i>thus</i>	24
<i>Examen microscopique.....</i>	25
<i>Essai de l'acétate.....</i>	25
<i>Réactions colorées du phytostérol.....</i>	26

CHAPITRE II

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DOSAGE DES STROPHANTHINES ; LEURS TECHNIQUES

A. — MÉTHODES CHIMIQUES.....	29
<i>Méthode de J. Barclay.....</i>	29
<i>Méthode de Fraser.....</i>	30
<i>Méthode de Cæsar et Loretz.....</i>	30
<i>Méthode de Modeen.....</i>	32
<i>Méthode de Haycock.....</i>	32
<i>Méthode de A. Leulier et H. Griffon.....</i>	33
B. — MÉTHODES PHYSIOLOGIQUES.....	36

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ESSAYÉES :

A. — ESSAI DE DOSAGE D'UNE TEINTURE DE STROPHANTHUS PAR LA MÉTHODE DE J. BARCLAY.....	41
B. — ESSAI DE DOSAGE D'UNE STROPHANTHINE PAR LA MÉTHODE DE J. BARCLAY.....	42
C. — ESSAI DE DOSAGE, PAR LA MÉTHODE DE BERTRAND, DU SUCRE RÉDUCTEUR FORMÉ PAR HYDROLYSE DES STROPHANTHINES, A PARTIR D'UN GLUCOSIDE.	44
<i>Principe de la méthode</i>	45
<i>Solutions nécessaires</i>	45
<i>Technique employée</i>	46
<i>Résultats</i>	47

CHAPITRE II

DOSAGE DE LA STROPHANTHIDINE DANS QUELQUES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES DE STROPHANTHUS PAR LA MÉTHODE DE MM. A. LEULIER ET H. GRIFFON :

A. — RÉACTIFS ET MATÉRIEL NÉCESSAIRES.....	51
B. — OBTENTION DE STROPHANTHIDINE ET PRÉPARATION D'UNE SOLUTION TITRÉE DE CE PRODUIT.....	52
C. — DOSAGE DE LA STROPHANTHIDINE DANS QUELQUES EXTRAITS DE STROPHANTHUS.....	54
a) <i>Extraction de la strophanthidine</i>	54
b) <i>Dosage colorimétrique de la strophanthidine</i> .	55
c) <i>Résultats</i>	57
D. — DOSAGE DE LA STROPHANTHIDINE DANS QUELQUES TEINTURES DE STROPHANTHUS.....	59
E. — ESSAI DE DOSAGE EN OUABAÏNE D'UNE TEINTURE DE STROPHANTHUS D'ORIGINE ALLEMANDE.....	63

CHAPITRE III

ESSAI DE DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE
TRANSFORMATION DES STROPHANTHI-
NES EN STROPHANTHIDINE :

TECHNIQUE	65
RÉSULTATS	66
CONCLUSIONS	71
BIBLIOGRAPHIE	73

